



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Publication number: **0 314 294 A3**

⑫

EUROPEAN PATENT APPLICATION

⑪ Application number: **88308820.5**

⑤ Int. Cl.⁵: **C12Q 1/68, C12Q 1/04,**
//C07H21/02

⑫ Date of filing: **22.09.88**

Pursuant to Rule 85(2)(3) EPC the priority of
11.09.87 US 96510 has been validly claimed.

⑩ Priority: **11.09.87 US 96510**

⑬ Date of publication of application:
03.05.89 Bulletin 89/18

⑭ Designated Contracting States:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑯ Date of deferred publication of the search report:
05.06.91 Bulletin
91/23

⑦ Applicant: **GENE-TRAK SYSTEMS**
Two California Avenue
Framingham Massachusetts(US)

⑧ Inventor: **Stackenbrandt, Erko**
Sturenhagener Weg. No. 5
W-2307 Daenischenhagen(DE)
Inventor: **Curiale, Michael**
2751 Tarpon Court
Homewood Illinois 60430(US)

⑨ Representative: **Deans, Michael John Percy et**
al
Lloyd Wise, Tregear & CO. Norman House
105-109 Strand
London WC2R OAE(GB)

⑤④ Detection of listeria.

⑤⑦ Nucleic acid fragments capable of hybridizing to
rRNA of Listeria monocytogenes and not to rRNA of
Bacillus subtilis are described.

EP 0 314 294 A3



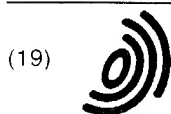
European
Patent Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 88 30 8820

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
X	J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM., vol. 71, no. 3, 1988, pages 669-673; J.D. KLINGER et al.: "Comparative studies of nucleic acid hybridization assay for Listeria in foods" * Whole article *	1,2,8,9, 11,14	C 12 Q 1/68 C 12 Q 1/04 // C 07 H 21/02
A	IDEM -----	15,16	
A	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 131, 1985, pages 543-551, SGM, GB; W. LUDWIG et al.: "The phylogenetic position of Streptococcus and Enterococcus" * Whole article *	1-16	
A	APP. ENVIRON. MICROBIOL., vol. 53, no. 9, 1987, pages 2256-2259, American Society for Microbiology; A.R. DATTA et al.: "Detection of hemolytic Listeria monocytogenes by using DNA colony hybridization" * Whole article *	1,15,16	
P,A	FR-A-2 616 808 (WASHINGTON STATE UNIV. RE-SEARCH FOUNDATION) * Pages 15,16; claims 1-9 *	1,15,16	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
			C 12 Q
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search		Date of completion of search	Examiner
The Hague		08 March 91	OSBORNE H.H.
<div>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</div> <div>X: particularly relevant if taken alone Y: particularly relevant if combined with another document of the same category A: technological background O: non-written disclosure P: intermediate document T: theory or principle underlying the invention</div> <div>E: earlier patent document, but published on, or after the filing date D: document cited in the application L: document cited for other reasons &: member of the same patent family, corresponding document</div>			



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 721 989 A1**

(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(43) Date de publication:
17.07.1996 Bulletin 1996/29

(51) Int Cl.⁶: **C12Q 1/68**, C07H 21/04,
C12P 19/34, C07K 14/255

(21) Numéro de dépôt: **96400098.8**

(22) Date de dépôt: **15.01.1996**

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL
PT SE**

(30) Priorité: **16.01.1995 FR 9500410**

(71) Demandeurs:
• **INSTITUT PASTEUR**
F-75724 Paris Cédex 15 (FR)
• **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)**
F-75654 Paris Cédex 13 (FR)

(72) Inventeurs:
• **Popoff, Michel, Yvan**
78370 Plaisir (FR)
• **Le Guern Fellous, Muriel**
92500 Rueil-Malmaison (FR)

(74) Mandataire: **Desaix, Anne et al**
Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A.
3, rue Chauveau-Lagarde
75008 Paris (FR)

(54) **Oligonucléotides pour la détection de salmonella**

(57) L'invention a pour objet de nouveaux moyens, comprenant des séquences de nucléotides, pour la détection notamment après amplification, de l'ADN ou de l'ADNc de S. enterica ou S. bongori.
L'invention concerne notamment les oligonucléotides représentés ci-dessous.

Iag1: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3'
Iag2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3'
Iag3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3'
Iag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3'
Iag5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3'
Iag6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3'
S1m1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3'
S1m2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3'
S1m3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3'
S1m4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3'
SS28: 5'-TAA TGC TTT CCT GGT GC-3'.
Iag7: 5'-T ACG GCA TGG GCT GAT TGC T-3'
Iag8: 5'-T TAC GCT ATC GCC CAG CAG CAG GA-3'
Iag9: 5'-T GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT C-3'
Iag10: 5'-A CAG TTG TTA CAG GAT CCC T-3'

EP 0 721 989 A1

Description

Le genre Salmonella contient deux espèces, Salmonella enterica espèce divisée en six sous-espèces, sur la base de caractères biochimiques et d'homologies au niveau de l'ADN, et Salmonella bongori. Le genre est subdivisé en plus de 2000 sérovariétés définies à l'aide d'antigènes somatiques et flagellaires. Les bactéries du genre Salmonella sont de façon générale pathogènes pour l'animal ou pour l'homme. On sait ainsi que les Salmonella sont parmi les agents responsables des empoisonnements alimentaires les plus courants dans les pays développés : c'est pourquoi des méthodes de détection rapides et fiables des sous-espèces de Salmonella sont importantes.

Les salmonelles responsables des toxi-infections alimentaires appartiennent majoritairement à la sous-espèce I (encore appelée groupe I) de S. enterica.

Les toxi-infections ne sont toutefois pas les seules pathologies provoquées par des infections par des Salmonella. Par exemple, Salmonella enterica sous-espèce enterica sérovariété typhi (ci-dessous dénommée Typhi) est l'agent causal de la fièvre typhoïde humaine.

Compte tenu de la nature des infections provoquées par les salmonelles et de la nécessité notamment de rechercher leur présence dans les prélèvements biologiques réalisés sur des patients ou dans les aliments, il apparaît indispensable de disposer de moyens rapides et sensibles pour en détecter leur présence.

Les méthodes standard de culture largement utilisées jusqu'à présent pour la détection des salmonelles nécessitent un temps important et ne sont pas adaptées par exemple pour suivre la contamination de produits alimentaires. Pour surmonter les désavantages de ces méthodes, plusieurs méthodes fondées sur des techniques de biologie moléculaire telles que des tests d'hybridation et des tests de réaction de polymérisation en chaîne, ont d'ores et déjà été proposées. Différentes sondes d'ADN ont été utilisées dans plusieurs protocoles d'hybridation et de PCR pour détecter les sous-espèces de Salmonella dans l'alimentation. Cependant, aucune de ces techniques n'est complètement satisfaisante, puisque les séquences utilisées ne sont pas totalement connues ou pas exclusivement présentes dans le genre Salmonella et ainsi, peuvent conduire à des réactions croisées entre la sonde et des séquences d'ADN d'autres enterobactéries ou peuvent conduire à un grand nombre de faux négatifs ou de faux positifs.

Les inventeurs ont recherché des moyens permettant la détection spécifique et sensible de l'ensemble des salmonelles des espèces S. enterica et/ou S. bongori. Dans cette optique, ils se sont intéressés à la souche Salmonella enterica sous-espèce enterica sérovariété typhi (S. Typhi) et au gène participant à l'invasion de cellules par S. Typhi.

De plus, ils ont défini certaines conditions permettant la détection spécifique de groupes déterminés de Salmonelles, par exemple des bactéries du Groupe I.

On a déjà montré dans l'état antérieur de la technique, que la souche Typhi est capable d'adhérer à des monocouches de cellules HeLa et d'entrer dans ces cellules (Yabuuchi et al, 1986). Cependant, jusqu'à présent, les déterminants génétiques impliqués dans ce processus d'adhésion et d'entrée dans les cellules, n'ont pas été clairement identifiés. Elsinghorst et al (1989) ont cloné un fragment chromosomique de Typhi, qui confère à des bactéries de type Escherichia coli la capacité de pénétrer dans les cellules Henle 407. Récemment, une autre région chromosomique impliquée dans l'invasion des cellules HeLa par la souche Typhi Ty2 a été identifiée et clonée (Popoff et Dion, 1990).

Les inventeurs de la présente demande ont identifié sur un fragment d'ADN de 2,4 kb de S. typhi contenu dans la séquence HindIII de 7,9 kb décrite par Popoff et Dion (1990), des régions susceptibles de participer à l'activité d'invasion de Salmonella enterica sous-espèce enterica sérovariété Typhi dans des cellules, et en particulier dans des cultures cellulaires de type HeLa, ces régions étant susceptibles en outre d'être utilisées dans des réactions pour la réalisation d'un diagnostic généralisé de tous les représentants des espèces S. enterica et/ou S. bongori ou éventuellement dans des conditions de détection particulières, pour le diagnostic spécifique du groupe I de S. enterica.

Une séquence appelée lagA et une séquence appelée lagB ont été identifiées par les inventeurs et caractérisées comme participant à l'invasion cellulaire se manifestant lors d'une infection due à Salmonella enterica sous-espèce enterica sérovariété Typhi.

La spécificité de ces séquences au sein de S. Typhi a conduit les inventeurs à proposer leur utilisation pour définir des moyens pour le diagnostic d'une infection par S. typhi, voire pour le diagnostic d'une infection par des Salmonella des espèces S. enterica et/ou S. bongori ou dans certains cas pour la mise en évidence de S. enterica de groupes spécifiques.

Ces moyens utilisables pour le diagnostic d'une infection par Salmonella enterica et/ou Salmonella bongori comprennent des oligonucléotides susceptibles d'être mis en oeuvre dans des réactions d'amplification de séquences de nucléotides, par exemple des réactions de polymérisation en chaîne. L'invention se rapporte aussi à des sondes pour la détection d'acides nucléiques de S. enterica ou d'une sous-espèce spécifique de S. enterica et/ou de S. bongori, ces acides nucléiques étant le cas échéant des fragments amplifiés.

L'invention a également pour objet un kit et une méthode de détection de la présence de Salmonella enterica et/ou de Salmonella bongori dans des échantillons biologiques et par exemple, dans des produits alimentaires ou dans tout échantillon faisant l'objet d'un diagnostic clinique. Ces méthodes et kits de détection sont selon un mode de réalisation particulier de l'invention, spécifiques des souches du groupe I de S. enterica.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ces méthodes permettent au contraire de rechercher la présence de bactéries S. enterica ou S. bongori du genre Salmonella. Le genre Salmonella comporte ainsi six sous-espèces ou groupes I, II, III, IV, V ou VI. Les sous-espèces I, II, III, IV et VI appartiennent à l'espèce S. enterica et la sous-espèce V appartient à l'espèce S. bongori.

L'invention concerne aussi les séquences de nucléotides, participant à l'invasion de cellules par Salmonella enterica sous-espèce enterica sérovariété Typhi, caractérisées en ce qu'il s'agit de l'une des séquences iagA ou iagB respectivement comprises entre les nucléotides 97 et 1755 de la séquence représentée à la figure 1 (iagA) et entre les nucléotides 1776 et 2255 de la séquence représentée à la figure 1 (iagB).

L'invention vise aussi des séquences de nucléotides modifiées par rapport à iagA ou iagB mais présentant néanmoins les mêmes propriétés s'agissant de l'invasion des cellules, ou hybridant dans des conditions stringentes avec l'une des susdites séquences.

La présente demande a également pour objet des protéines iagA et iagB répondant aux séquences présentées à la figure 1 ou des variantes de ces séquences obtenues par mutation, délétion ou addition d'acides aminés dès lors que la séquence ainsi obtenue est reconnue par des anticorps dirigés contre l'une des susdites séquences iagA ou iagB.

De façon générale, l'invention a pour objet toute séquence d'acides aminés codée par les gènes iagA et iagB représentés à la figure 1.

L'invention concerne par ailleurs tout fragment de l'une de ces séquences, en particulier tout fragment sous forme purifiée, suffisant pour conserver à S. typhi ses propriétés d'adhésion et d'infection des cellules, et en particulier des cellules HeLa en culture.

Le procédé d'infection des cellules HeLa en culture est le procédé standard qui a notamment été décrit dans la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 92/01056.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des moyens pour la détection de la présence de S. enterica et/ou S. bongori et le cas échéant, pour la quantification de S. enterica et/ou S. bongori dans des échantillons biologiques.

Par échantillon biologique, on entend tout échantillon prélevé pour la réalisation d'analyses *in vitro* chez l'animal ou chez l'homme ou prélevé à partir de produits alimentaires quelle qu'en soit la nature ou à partir de tout milieu liquide, solide ou gazeux susceptible de contenir les agents pathogènes recherchés.

L'invention a pour objet dans ce cadre, une séquence de nucléotides, comportant au moins 9 nucléotides, caractérisée en ce qu'elle hybride avec l'une des séquences iagA ou iagB présentées ci-dessus.

Les conditions d'hybridation dont il est question précédemment sont définies en fonction de la spécificité recherchée de l'hybridation et des conditions appropriées sont données à titre indicatif dans les exemples de la présente demande.

De façon préférée, l'invention concerne des oligonucléotides issus de la partie C-terminale de la séquence iagA représentée à la figure 1.

Des séquences de type oligonucléotides peuvent être sélectionnées pour être utilisées comme amorces soit pour la détection après amplification, de l'ADN génomique ou de l'ADNc de Salmonella de l'espèce S. enterica et/ou de l'espèce S. bongori appartenant aux autres groupes I à VI ou d'une partie de ces groupes soit dans d'autres conditions pour la détection spécifique de S. enterica du groupe I. Il peut s'agir notamment de séquences de nucléotides obtenues par synthèse chimique selon les méthodes connues de l'homme du métier.

Des oligonucléotides préférés, utilisables pour l'amplification d'acide nucléique caractéristique de bactéries appartenant à l'un des groupes I, II, IIIa, IIIb, IV, V ou VI du genre Salmonella et notamment de l'ADN génomique ou de l'ADNc de S. enterica et/ou de S. bongori sont par exemple les suivants (leur position au sein de la séquence iagA représentée à la figure 1 étant indiquée) :

		position
	Iag1: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3'	1424-1443
5	Iag2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3'	1585-1605
	Iag3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3'	1495-1521
	Iag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3'	1564-1584
10	Iag5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3'	1318-1337
	Iag6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3'	1637-1657
	S1m1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3'	709-728
	S1m2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3'	1014-1031
15	S1m3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3'	732-762
	S1m4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3'	823-842
20	SS28: 5'-TAA TGC TTT CCT GGT GC-3'.	

D'autres oligonucléotides susceptibles d'être utilisés comme amorces pour l'amplification de l'ADN ou de l'ADNc du gène iagB de l'ensemble des souches *Salmonella* des espèces *S. enterica* et/ou *S. bongori* ont été définies à partir de la séquence iagB représentée à la figure 1.

L'invention a donc pour objet les oligonucléotides répondant aux enchainements suivants :

- Iag7: 5'-T ACG GCA TGG GCT GAT TGC T-3'
- Iag8: 5'-T TAC GCT ATC GCC CAG CAG CAG GA-3'
- Iag9: 5'-T GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT C-3'
- Iag10: 5'-A CAG TTG TTA CAG GAT CCC T-3'

Ces oligonucléotides peuvent également être utilisés comme sondes, par exemple pour la détection des produits d'amplification de l'ADN et/ou de l'ADNc de *S. enterica* et/ou de *S. bongori*.

Un couple d'amorces préféré pour réaliser l'amplification de l'acide nucléique de *S. enterica* et/ou de *S. bongori*, quel que soit le groupe d'appartenance de la bactérie, est par exemple formé des amorces iag5 (sens) et iag6 (anti-sens).

Ce couple d'amorces dirige l'amplification d'un fragment d'acide nucléique de 340 bp.

Un autre couple d'amorces préféré est formé des amorces S1m1 (sens) et S1m2 (antisens). Ces amorces sont susceptibles de s'hybrider avec l'ADN ou l'ADNc de bactéries *S. enterica* et/ou de *S. bongori* de l'un des groupes I, II, III, IV, V ou VI.

Selon un autre mode de réalisation préféré, l'invention concerne des oligonucléotides utilisables comme amorces pour la détection spécifique de *Salmonella enterica* Groupe I lorsque les conditions de détection après l'amplification de l'ADN ou de l'ADNc sont celles qui sont décrites dans l'exemple I.

De telles amorces sont caractérisées par leur capacité à amplifier des séquences d'acide nucléique des souches de *S. enterica* ou de *S. bongori* représentatives des groupes I, II, III, IV, V et VI, mais pour lesquelles les conditions de détection sont celles exposées dans l'exemple I, permettant la seule détection des bactéries du groupe I.

Un couple d'oligonucléotides utilisables à ces fins, en tant qu'amorces spécifiques pour la détection de séquences d'ADN ou d'ADNc de *S. enterica* du groupe I est par exemple constitué par les séquences suivantes :

SS2 5'-CCGGGCAGATGATACCC-3' et
SS28 5'-TAATGCTTTCCTGGTGC-3'.

Les oligonucléotides définis par les inventeurs, permettent d'envisager le diagnostic de *S. enterica* et/ou de *S. bongori* dans des conditions satisfaisantes de sensibilité, de rapidité, de facilité et de spécificité.

L'invention également a pour objet un kit pour la détection de *S. enterica* et/ou de *S. bongori* par amplification de l'ADN génomique ou complémentaire de *S. enterica* et/ou de *S. bongori*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des oligonucléotides tels que décrits précédemment, capables d'hybrider dans des conditions stringentes avec l'ADN génomique ou l'ADNc de S. enterica et/ou de S. bongori
- une sonde pour la détection des fragments amplifiés répondant à l'une des définitions données dans les pages précédentes.
- les réactifs nécessaires à la réalisation de la réaction d'amplification

L'invention a donc en particulier pour objet, l'utilisation des oligonucléotides précités, comme amorces pour l'amplification d'une séquence d'ADN ou d'ADNc de Salmonella enterica et/ou de Salmonella bongori, comprise dans l'une des séquences iagA ou iagB telles que décrites dans les pages précédentes ou complémentaires d'une telle séquence, ou encore l'utilisation de ces oligonucléotides comme sonde pour la détection d'une séquence de nucléotides amplifiée.

Par exemple, les oligonucléotides iag5 et iag6 peuvent être utilisés respectivement comme amorces sens et antisens pour la détection de S. enterica et/ou de S. bongori du groupe I, II, III, IV, V ou VI.

De même, le couple d'amorces Sim1 et Sim2 peut être utilisé pour la détection de bactéries de l'espèce S. enterica et/ou de S. bongori de l'un de ces groupes dans un échantillon biologique.

L'invention concerne également l'utilisation des oligonucléotides SS2 et SS28 pour la détection spécifique in vitro dans un échantillon biologique de S. enterica du groupe I.

La détection est spécifique lorsque les amorces utilisées pour l'amplification des séquences de nucléotides recherchées permettent l'amplification de bactéries S. enterica et/ou de S. bongori appartenant à l'un des autres groupes II, III, IV, V ou VI, mais que les conditions mises en oeuvre ne permettent pas la détection des bactéries de ces mêmes groupes ou d'organismes différents susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique testé.

L'invention concerne ainsi un ensemble d'oligonucléotides utilisables pour la détection de bactéries S. enterica et/ou de S. bongori, après amplification de l'ADN génomique ou complémentaire de S. enterica et/ou de S. bongori, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un couple d'oligonucléotides répondant aux définitions précédemment données, capables d'hybrider dans des conditions stringentes avec l'ADN génomique ou l'ADNc de S. enterica et/ou de S. bongori.
- une sonde répondant aux caractéristiques données ci-dessus.

Un premier ensemble d'oligonucléotides utilisables pour la détection in vitro dans un échantillon biologique, de souches de Salmonella enterica et/ou de S. bongori appartenant à l'un des groupes I, II, III, IV, V ou VI, est caractérisé en ce qu'il contient les oligonucléotides suivants :

- la séquence iag5 (5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3' et la séquence iag6 (5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3') utilisables en tant qu'amorces pour l'amplification et
- la séquence iag3 (5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3') utilisable comme sonde de révélation et la séquence iag4 (5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3') utilisable comme sonde de capture.

Un autre ensemble d'oligonucléotides utilisables pour la détection spécifique in vitro dans un échantillon biologique, de S. enterica du groupe I, est caractérisé en ce qu'il comprend les oligonucléotides suivants :

**SS2 (5'-CCGGGCACATGATACCC-3' et
SS28 (5'-TAATGCTTTCCTGGTGC-3').**

La présente demande a par ailleurs pour objet une protéine iagA codée par la séquence de nucléotides iagA représentée à la figure 1 ainsi qu'une protéine iagB codée par la séquence de nucléotides iagB représentée à la figure 1.

De façon préférée, les protéines iagA et iagB ont respectivement les séquences d'acides aminés représentées à la figure 1.

Entre également dans le cadre de l'invention un procédé pour la détection in vitro dans un échantillon biologique, de séquences de nucléotides Salmonella enterica et/ou de S. bongori, préalablement amplifiées par exemple par PCR caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- dénaturation de la séquence de S. enterica et/ou de S. bongori amplifiée.
- mise en contact des séquences de nucléotides amplifiées dénaturées de S. enterica et/ou de S. bongori, avec une sonde de capture et une sonde de révélation obtenues à partir des oligonucléotides ci-dessus définis dans des conditions permettant l'hybridation desdites sondes de capture et de révélation avec la susdite séquence de nucléotides amplifiée de S. enterica et/ou de S. bongori, la sonde de capture étant fixée à la surface d'un puits d'une plaque de microtitration et la sonde de révélation étant marquée et libre dans un tampon d'hybridation approprié ;

EP 0 721 989 A1

- incubation du mélange réactionnel, pendant un temps suffisant pour permettre la réaction d'hybridation ;
- lavage pour éliminer les oligonucléotides n'ayant pas réagi ;
- révélation des sondes de révélation ayant hybridé aux séquences de nucléotides amplifiées.

5 Le procédé de détection précédemment décrit peut être avantageusement caractérisé en ce que la détection est réalisée conformément aux étapes suivantes :

- dénaturation d'un volume 10 µl de la séquence amplifiée par addition volume à volume d'une solution 200 mM NaOH 40mM EDTA.
- 10 - préhybridation des microplaques dont la surface des puits est revêtue de la sonde de capture, dans un tampon d'hybridation approprié.
- libération de la microplaque et remplissage de chacune des cupules avec 200µl de tampon d'hybridation renfermant le fragment amplifié dénaturé et la sonde de révélation marquée à la peroxydase à la concentration de 10ng/µl.
- 15 - incubation du mélange pendant une heure à 37°C sous agitation.
- lavage du mélange ayant réagi avec une solution de lavage 10X (100mM Tris, 3M NaCl, 1% Tween 20, pH 7.4).
- détection de l'activité de la peroxydase liée à la sonde par colorimétrie en présence d'un substrat coloré.

20 La révélation de l'activité de la peroxydase présente sur la sonde de révélation peut être obtenue par mise en oeuvre des étapes suivantes :

- dépôt de 200µl d'une solution 40mM citrate trisodique, 0.03% H₂O 30%, 7.5mg/ml d'orthophenylenediamine (OPD) dans chacun des puits contenant le mélange de réaction.
- incubation de la microplaque pendant 30min à l'obscurité et à 37°C.
- 25 - blocage de la réaction par addition de 50µl/puits d'une solution 4N H₂SO₄.
- détermination de la densité optique à une longueur d'onde de 492nm (référence à 620nm).

De façon intéressante, la sonde de capture utilisée est l'oligonucléotide lag4 et la sonde de révélation est l'oligonucléotide lag3.

30 Ainsi, les moyens définis dans le cadre de l'invention permettent la détection qualitative ou quantitative de la présence de bactéries de type S. enterica et/ou de S. bongori, qu'il s'agisse d'une détection non spécifique au sein de l'un des groupes I, II, III, IV, V ou VI de S. enterica et/ou de S. bongori.

Dans des conditions spécifiques de mise en oeuvre de l'étape de détection, telles qu'exposées dans l'exemple I, les amorces SS2, SS28 et la sonde SS40 permettent au contraire la détection spécifique de bactéries du groupe I de S. enterica.

35 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples qui suivent et dans les figures :

Figure 1 : Séquence de nucléotide d'un fragment d'ADN de 2.4 kb de la région d'invasion de Salmonella ser. Typhi. Les sites potentiels de liaison au ribosome sont soulignés.

40 Figure 2 : Pourcentage de l'activité obtenue avec différentes souches de Salmonella appartenant à différentes sérovariétés par hybridation sandwich.

Sérovariétés des différents isolats de Salmonella testés :

- a: S. enterica sous-espèce enterica (I), réf.: C53
- 45 b: S. enterica sous espèce salamae (II), réf.: 975-71
- c: S. enterica sous espèce salamae (II), réf.: 3975-83
- d: S. enterica sous espèce arizonae (IIIa), réf.: 1600 K
- e: S. enterica sous espèce arizonae (IIIa), réf.: So 20-20
- f: S. enterica sous espèce diarizonae (II), réf.: 5250-85
- 50 g: S. enterica sous espèce diarizonae (IIIb), réf.: 8013-93
- h: S. enterica sous espèce houtenae (IV), réf.: 1357-73
- i: S. bongori, réf.: 2790-79
- k: S. enterica sous espèce indica (VI), réf.: 4355-84 - 7, 6, 5, 4, et 3: log (montant des molécules d'ADN).

55 Figure 3 : Alignement des séquences des fragments amplifiés (nucléotides 1345 à 1644) des 6 groupes de Salmonelles.

Figure 4 : Amplification grâce aux amorces lag5 et lag6 sur deux représentants de chacun des groupes de Salmonelles.

Figure 5 : Autoradiographie du Southern blot des produits amplifiés des Salmonelles.

Figure 6 : Détermination du nombre minimal de molécules d'ADN chromosomique pouvant être détecté. Autoradiographie du Southern blot et hybridation sur microplaque.

Figure 7 : Localisation des oligonucléotides sélectionnés au sein du gène *iagA*

EXEMPLE 1

CLONAGE ET SEQUENCAGE DU FRAGMENT D'ADN DE 2.4 kb

Ce fragment d'ADN a été sous-cloné en utilisant un fragment de restriction obtenu par coupure avec les enzymes HindIII, à partir de la séquence HindIII de 7.9 kb décrite dans la publication de Popoff et Dion, 1990, dans des dérivés du vecteur m13 (Messing et Vieira, 1982).

Après la réalisation de ce clonage, la méthode de dideoxy terminaison de chaîne a été mise en œuvre en utilisant la T7 DNA polymérase modifiée (Sequenase, USB Corp.) et des oligonucléotides synthétiques universels à titre d'amorces. Toutes les extrémités des fragments de restriction utilisés se chevauchaient les uns les autres. Le séquençage de l'ADN a été réalisé au moins 2 fois sur chacun des brins. La séquence de nucléotides a été analysée en utilisant le programme de Lipan et Pearson, 1985.

Comme le montre la séquence présentée à la figure 1, deux phases ouvertes de lecture sont contenues dans le fragment séquencé : elles sont désignées par les termes *iagA* (abréviation de invasion associate gene) et *iagB*. Les deux phases ouvertes de lecture sont transcrites dans la même orientation. Le premier codon ATG (bp 97) de la phase ouverte de lecture de l'*iagA*, qui est précédé par la séquence 5'-AGAGA-3', est supposé correspondre au site d'initiation de la traduction du gène *iagA*. Le gène *iagA* code pour un polypeptide comportant 553 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 63026 Da. Une homologie significative a été détectée entre le domaine N-terminal de la protéine *iagA* et le domaine correspondant à la protéine de régulation de la transcription PhoB (24% d'identité et 52% de similitude pour une superposition de 108 acides aminés) et la protéine PhoP (25% d'identité et 69% de similitude pour 100 acides aminés alignés) de *E. coli*. Le codon d'initiation ATG du gène *iagB* (bp 1776) est également précédé par un site potentiel de liaison au ribosome (5'-AGGAAG-3'). Le gène *iagB* code pour un polypeptide comportant 160 acides aminés et ayant un poids moléculaire calculé de 18369 Da. La comparaison de la séquence de la protéine *iagB* avec les séquences traduites contenues dans la banque de données Genbank a montré une homologie significative avec la protéine IpgF (43% d'identité et 66% de similitude pour 151 acides aminés alignés).

La protéine IpgF est codée par le gène *ipgF* qui est situé sur le plasmide associé à la virulence de *Shigella flexneri*, à l'extrémité 5' du locus *mxi-spa* (Allaoui et al, 1993).

Les protéines mises en évidence de *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérovariété Typhi auraient donc un rôle dans l'infection par ces bactéries, et notamment dans l'adhésion et la pénétration dans les cellules.

EXEMPLE 2

DETECTION SPECIFIQUE DE *S. ENTERICA* DU GROUPE I

Un protocole de détection des sous-espèces de *Salmonella* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été mis au point. Un couple d'oligonucléotides utilisés comme amorce a été défini pour amplifier un fragment de 93 pb d'un gène requis pour l'invasion des cellules HeLa par *S. typhi*, souche Ty2. Le produit d'amplification a été analysé par une hybridation non radioactive en sandwich sur des plaques de microtitration en utilisant deux oligonucléotides différents selon la procédure décrite par Chevrier et al, 1993, Mol. Cell. Probes 7, 187-197. L'oligonucléotide de capture a été phosphorylé à son extrémité 5' et lié de façon covalente à des puits portant des groupes aminés d'une plaque de microtitration. L'oligonucléotide de détection a été aminé à son extrémité 5' puis marqué avec un biotiny-N-hydroxy-succinimide ester. Après hybridation, les molécules hybrides ont été détectées par de l'avidine conjuguée à la phosphatase alcaline et à un substrat chromogène. Cette méthode nécessite seulement l'utilisation d'un cyclé thermique et d'un lecteur de microtitration conventionnel, et peut être mise en œuvre sur une large échelle.

MATERIELS ET METHODES

Souches bactériennes

Deux cent vingt huit isolats cliniques (Tableau 1) incluant *S. bongori* (Sambrook et al, 1989, Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), *S. enterica* sous espèce I(116), II(56), IIIa(11), IIIb(30), IV(5) et VI(5) et 16 souches d'Enterobactéries non-salmonelles (Tableau 2) représentant 9 genres différents ont été utilisés dans cette étude. La souche C53 de *S. ser. Typhimurium* a été utilisée comme contrôle positif, et la souche HB101 de *E. coli* a été utilisée comme contrôle négatif dans les tests de PCR.

Extraction de l'ADN

Les souches ont été cultivées sur un milieu LB à 37°C. Afin de procéder à l'extraction rapide de l'ADN, 2 ml de la culture maintenue pendant toute la nuit ont été centrifugés et resuspendus dans 1 ml de TE (tampon 10 mM Tris-HCl à pH 8 contenant 1 mM EDTA). Les cellules ont été centrifugées, le culot de centrifugation a été resuspendu dans 500 µl d'eau distillée stérile et chauffé à 100 °C pendant 10 minutes. Finalement, la solution a été centrifugée et le surnageant a été conservé pour des expérimentations en PCR.

Amorces oligonucléotidiques et sondes

Les oligonucléotides ont été synthétisés dans un synthétiseur à ADN cyclone (Millipore-Waters) en utilisant la technologie au phosphoramidite.

Les séquences des amorces d'oligonucléotides étaient les suivantes

SS2: 5'-CCGGGCAGATGATACCC-3' et

SS28: 5'-TAATGCTTTCCTGGTGC-3'.

La sonde oligonucléotidique de capture.

SS40: 5'-CCCGAACTATCTCGATCTGTACAATATTATCATT-3'

a été phosphorylée à son extrémité 5' avec la T4 polynucléotide kinase (Boehringer) selon la description faite par Sambrook et al. 1989. (Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). La sonde de détection octadécanucléotidique SS41 (5'-GCAGGTGATAACCTTTAA-3') a été synthétisée avec une fonction amino à son extrémité 5' en utilisant la méthode au phosphoramidite sur phase solide dans un synthétiseur d'ADN Applied Biosystem 380B puis marquée avec le D-biotinyl- Σ -aminocaproic acide-N-hydroxysuccinimide ester (Boehringer) selon la description faite par Tham et al. 1990. (FEMS Microbiol. Lett. 69, 109-116). Les oligonucléotides de capture et de détection ont été tous les deux purifiés sur une colonne de dessalement rapide HR 10/10 avec le système FPLC (Pharmacia).

Expériences de PCR

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume total de 100 µl dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8.5, contenant 4 mM MgCl₂, 100 µg/ml de sérum albumine bovine, 1 µM de chaque amorce, 200 µM de chaque dNTP et 1 U de Taq ADN polymérase (Amersham). Le mélange d'amplification a été recouvert avec 100 µl d'huile minérale et soumis à 10 cycles d'amplification selon la description suivante : les échantillons ont été incubés à 94°C pendant 10 sec pour dénaturer l'ADN, à 60°C pendant 10 secondes pour appairer les amorces à l'ADN et à 72°C pendant 30 sec. pour réaliser la réaction d'extension des amorces appariées, ceci étant suivi de 30 cycles selon le protocole suivant : dénaturation à 87°C pendant 10 sec., appariement à 60°C pendant 10 sec. et extension à 72°C pendant 30 sec. Les cycles thermiques ont été réalisés dans un ensemble chauffant programmable (Thermal reactor Hybaid, UK).

Les expériences de PCR ont été réalisées avec 5 µl de solution d'ADN. Chaque expérience comprenait des contrôles négatifs (5 µl de tampon TE) pour chaque groupe de 10 échantillons et à la fin de chaque série.

Tests d'hybridation sandwich sur des bandes CovaLink NH®

Deux protocoles d'hybridation non-radioactive sur des bandes CovaLink NH® ont déjà été décrits par Chevrier et al (1993, Mol. Cell. Probes 7, 187-197). Dans le cas présent, une technique d'hybridation sandwich a été utilisée dans la mesure où elle permettait une meilleure sensibilité de la détection. La réaction a été réalisée sur des micropuits recouverts par de l'oligonucléotide SS40 en utilisant une procédure de liaison covalente telle que décrite en détails par Chevrier et al ou Rasmussen, S.R. et al (1991, Anal. Biochem. 198, 138-142).

Le fragment d'ADN soumis à la réaction de PCR a été dénaturé directement dans les puits en ajoutant de façon séquentielle 95 µl d'eau distillée, 5 µl d'échantillon de PCR, 40 µl de sonde de détection et 14 µl de NaOH 1 N par puits. Après 10 minutes, la neutralisation a été effectuée en ajoutant 21 µl de NaH₂PO₄ 1 M contenant 1% de sarkosyle. Tous les échantillons ont été réalisés en double. Après la neutralisation, la bande a été déposée sur une surface métallique et maintenue dans un four pendant la nuit à 40°C. La concentration finale de la sonde de détection biotinylée SS41 était 0.5 nM. Pendant l'incubation dans le four, il est préférable de ne pas laisser les puits non utilisés vides, mais de les remplir avec de l'eau de façon à obtenir des échanges thermiques homogènes. Les micropuits ont été lavés 5 fois à température ambiante avec du TBS-Tw (0,15 M NaCl, 10 mM tampon Tris HCl à pH 8, 1%, Tween 20).

100 µl de conjugué alcaline phosphatase-extravidine (Sigma) dilués à 1 µg/ml dans du TBS-Tw contenant 1% de sérum albumine bovine ont été ajoutés par puits. Puis, la bande a été incubée à température ambiante pendant 1 h, lavée 5 fois avec du TBS-Tw et finalement 200 µl de diéthanamine 1 M à pH 9.8 contenant 1 mM de MgCl₂ et 1 mM de para-nitrophényl phosphate ont été ajoutés. La réaction de l'enzyme a été conduite pendant 30 minutes à 2 heures. L'absorbance a été mesurée à 405 nm en utilisant un lecteur de microplaque (Dynatech). Le signal obtenu avec la solution standard du fragment d'ADN amplifié (800 fm/puits) de *S. ser. Typhimurium* souche C53 a été considéré comme représentant 100% et utilisé comme référence pour chaque test d'hybridation. Les valeurs des blancs correspondent à l'absorbance moyenne mesurée dans des puits recouverts par l'oligonucléotide SS40 incubé seulement avec 0.5 nM de sonde oligonucléotidique SS41 biotinylée.

RESULTATS

Optimisation de la méthode

Les amorces et les sondes ont été choisies dans la séquence iagA. Différents couples d'amorces ont été testés pour optimiser la technique d'hybridation sandwich sur des microplaques CovaLink. Le couple d'amorces choisi (SS2 et SS28) a permis l'amplification spécifique de la région de 93 pb de l'ADN génomique de *Salmonella*. En utilisant ce couple d'amorces, on a mis en évidence qu'une concentration standard de MgCl₂ (1.5-2 mM) a conduit à un résultat d'amplification relativement inintéressant et qu'une concentration de 4 mM en MgCl₂ était nécessaire pour obtenir une amplification efficace. Des oligonucléotides internes, SS40 et SS41, ont été utilisés dans un test d'hybridation non radioactif à titre de sonde de capture et de sonde de détection respectivement.

Spécificité de la technique

La spécificité de la méthode pour la détection des salmonelles a été évaluée avec 228 souches de *Salmonella* (Tableau 1) et 16 souches de bactéries hétérologues (Tableau 2). Les résultats sont résumés dans le tableau 3. *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella pneumoniae*, des espèces d'*Enterobacter* et d'*Acinetobacter*, *Pasteurella*, *Vibrio harveyi*, *Serratia marcescens* et de façon plus importante des espèces de *Citrobacter* et tous les *E. coli* ont donné un signal d'hybridation inférieur à 20%. Sur la base de cette valeur, il a été conclu que toutes les souches de *Salmonella* appartenant à la sous-espèce I pouvaient être détectées par la présente méthode. De plus, seulement une souche (souche 3975-83) des 56 souches de la sous-espèce II et 3 souches des 11 souches de la sous-espèce IIIa ont donné un signal positif.

Salmonella bongori et les souches appartenant aux sous-espèces IIIb, IV et VI n'étaient pas détectables.

Niveau de détection de la technique avec les bactéries entières

Des dilutions au 1/10^{ème} d'une suspension de la souche C53 de *S. ser. Typhimurium* (de 10⁹ à 10⁻² cellules/ml) ont été faites pour estimer le nombre minimum de bactéries qui pouvait être détecté par la PCR suivi de la technique d'hybridation non radioactive. L'ADN a été extrait de chaque suspension calibrée, en utilisant la technique d'extraction rapide par ébullition. Les résultats obtenus montrent clairement que la technique d'extraction rapide de l'ADN par la simple ébullition de la suspension avant la réaction de PCR, est une technique efficace. En effet, elle permet la détection de seulement une unité cfu.

Tableau 1 :

Sous-espèces de <i>Salmonella</i> utilisées pour évaluer la spécificité des essais d'hybridation de l'ADN		
Microorganisme testé	N° des isolats	N° des serovas
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> I	116	43
serovar Adelaide		1
Agona		2
Altona		1
Angoda		1
Bardo		2
Blockley		1
Bovismorbificans		3

EP 0 721 989 A1

Tableau 1 (suite)

Sous-espèces de <i>Salmonella</i> utilisées pour évaluer la spécificité des essais d'hybridation de l'ADN.			
	Microorganisme testé	N° des isolats	N° des serovas
5	Braenderup		4
	Brandenburg		1
	Bredeney		1
	Broughton		2
10	Cerro		1
	Chester		1
	Coeln		1
	Concord		1
	Dakar		1
15	Derby		2
	Enteridis		28
	Georgia		1
	Hadar		1
20	Heidelberg		4
	Ibadan		2
	Indiana		1
	Infantis		5
	Lexington		1
25	London		1
	Mbandaka		1
	Montevideo		6
	Moscow		1
30	Ohio		1
	Orion		1
	Panama		3
	Paratyphi B		2
	Saintpaul		1
35	Typhimurium		13
	Typhisuis		1
	Vaertan		1
	Veneziana		1
40	Vinohrady		1
	Virchow		10
	Wien		1
	Woodinville		1
	Yolo		1
45	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>salamae</i> II	56	56
	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>arizonae</i> IIIa	11	29
	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>diarizonae</i> IIIb	30	5
	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>houtenae</i> IV	5	5
	<i>Salmonella enterica</i> Subsp <i>indica</i> VI	5	5
50	<i>Salmonella bongori</i>	5	5
	(initialement <i>S. enterica</i> subsp. <i>bongori</i> V)		

55

Tableau 2

Bactéries hétérologues utilisées dans le test d'hybridation de l'ADN		
Genre	Espèces	Nombre d'isolats
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	4
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>	1
<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	1
	<i>freundii</i>	1
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	1
<i>Enterobacter</i>	<i>agglomerans</i>	1
	<i>asburiae</i>	1
	<i>hormoechei</i>	1
<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	1
<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	1
	<i>haemolyticus</i>	1
<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>	1
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	1

Tableau 3 :
Souches cliniques de bactéries et témoins testés dans un essai d'hybridation Sandwich

	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houstenae</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	<i>S. bongori</i>	Non <i>Salmonella</i> sans ADN	Témoin
activité (%)									
100%-20%	116	1	3	0	0	0	0	0	0
19%	0	51	8	12	4	4	5	9	0
> blanc									
< blanc	0	4	0	18	1	1	0	7	23
Total	116	56	11	30	5	5	5	16	23

Hybridation quantitative avec l'ADN génomique purifié

La procédure d'hybridation non-radioactive utilisée dans les tests rapportés ici peut être facilement mise en œuvre dans des études quantitatives. Pour comparer les signaux d'hybridation obtenus avec différentes souches de *Salmonella*, l'ADN a été extrait de 10 souches représentant les 6 sous-espèces de *Salmonella enterica* et l'espèce *Salmonella bongori*, puis des quantités calibrées d'ADN ont été soumises à des réactions de PCR suivies par une hybridation sandwich. Les résultats sont rapportés à la figure 2. Il a été démontré que le signal d'hybridation obtenu avec 10⁷ molécules d'ADN de *Salmonella bongori* ou des sous-espèces II, IIIa, IIIb, IV et VI de *Salmonella enterica* est plus faible que le signal d'hybridation observé avec 10³ molécules d'ADN des souches de la sous-espèce I. Cependant, il est important de noter que l'isolat 3975-83 (sous-espèce II) a donné le même signal d'hybridation que les souches appartenant aux sous-espèces I.

DISCUSSION

L'amplification par PCR permet une détection très sensible de séquences d'ADN spécifique. La sensibilité de l'amplification dépend essentiellement du nombre de copies de l'ADN cible, de la pureté de l'échantillon à analyser, de la méthode d'extraction de l'ADN, et de la sensibilité de la méthode utilisée pour détecter les produits de PCR. La visualisation des produits de PCR par une coloration au bromure d'éthidium dans un gel d'électrophorèse, n'est pas compatible avec l'utilisation en routine de la technique et n'est pas suffisamment sensible. La sensibilité peut être améliorée par l'utilisation de la PCR double ou de sondes d'ADN avec une hybridation en Dot blot ou en Southern blot. Cependant la PCR double est très sensible à la contamination par de l'ADN et les techniques d'hybridation Dot blot ou Southern blot ne sont pas appropriées pour l'automatisation. L'hybridation sur microplaque offre donc une technique appropriée pour la détection et la quantification de fragments amplifiés par PCR. L'attachement covalent simple des acides nucléiques à des micropuits représente une variante intéressante à l'adsorption passive et une amélioration importante pour la détection de fragments amplifiés par PCR sur des micropuits.

Il est connu que les souches de *Salmonella* provoquant des infections chez l'homme appartiennent essentiellement à la sous-espèce I. En effet, plus de 95% des isolats cliniques chez l'humain appartiennent à cette sous-espèce (Rowe, B., 1987, *Salmonella* surveillance. Reports received from centers participating in the WHO programme. World Health Organization London). De plus, en 1991, le "Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires" de Paris (France) rapportait [Corbion, B. et al. 1991. Inventory of *Salmonella*] que dans les années précédentes, la plupart des souches isolées chez l'animal dans la nourriture ou dans l'environnement en 1988 et 1989 (c'est à dire, 18832 souches) appartient à la sous-espèce I (99.2%).

Les résultats rapportés ici ont permis de définir une méthode fondée sur l'amplification par PCR pour la détection de souches pathogènes de *Salmonella*. Un couple d'amorces, SS2 et SS28, et un couple de sondes, SS40 et SS41 ont été sélectionnés à partir d'un gène nécessaire à l'invasion des cellules HeLa par *Salmonella* ser. Typhi souche Ty2. En utilisant la combinaison entre la technique de PCR et l'hybridation sandwich non radioactive sur microplaque, toutes les *Salmonella* de la sous-espèce I ont été détectées.

La limite de détection était inférieure à un seuil représenté par 10 cellules par tube de PCR, ce qui est conforme aux résultats obtenus par d'autres techniques de PCR similaires. Etant donné la parenté des acides nucléiques entre les membres des enterobactéries, il était important de contrôler la spécificité de ces nouvelles amorces et sondes avec les genres d'enterobactéries les plus susceptibles de conduire à des réactions de type "faux-positif". Des résultats obtenus, on peut conclure qu'aucune réaction de faux-positif ne peut avoir lieu lorsque les conditions de la PCR et de l'hybridation décrites précédemment sont suivies.

Il est intéressant de noter que la souche *Salmonella* 3975-83 (sous-espèce II) présentait un signal d'hybridation identique à celui obtenu avec les isolats appartenant à la sous-espèce I. Cette souche a été isolée en 1983 à partir des selles d'un patient humain en Grande-Bretagne. Sur la base des caractéristiques biochimiques, cette nouvelle sérovariété a été classée dans la sous-espèce II mais a été considérée comme une souche atypique puisque sa présence dans la gélatinase n'a pas été détectée (Le Minor, L. et al. 1984. Supplement No. XXVII. 1983. to Kauffmann-White Scheme. Ann. Microbiol. (Institut Pasteur) 135 B. 45-51). A la lumière des résultats rapportés ici, la position taxonomique de la souche 3975-83 devrait être ré-examinée en utilisant la technique d'hybridation ADN-ADN.

Les données présentées ici indiquent que la méthode d'hybridation basée sur l'utilisation d'un gène nécessaire à l'invasion des cellules HeLa par *Salmonella* ser. Typhi souche Ty2 peut distinguer les souches de la sous-espèce I des *Salmonella* des autres bactéries enteriques, y compris *E. coli*. L'hybridation non-radioactive sur une microplaque Covalink NH est sensible et appropriée pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

EXEMPLE 3 : DETECTION DE L'ADN DE SALMONELLA AMPLIFIE PAR HYBRIDATION SANDWICHSéquence des oligonucléotides

5 Les fragments d'ADN choisis sont les suivants (voir position sur la séquence de la figure 1) :
Partie C-terminale

		position
10	Iag1: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3'	1424-1443
	Iag2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3'	1585-1605
	Iag3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3'	1495-1521
	Iag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3'	1564-1584
15	Iag5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3'	1318-1337
	Iag6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3'	1637-1657
20	SIm1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3'	709-728
	SIm2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3'	1014-1031
	SIm3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3'	732-762
25	SIm4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3'	823-842

Préférentiellement, le couple d'amorces Iag5 (sens) et Iag6 (antisens) dirige l'amplification d'un fragment de 340bp, le couple SIm1 (sens) et SIm2 (antisens) dirige l'amplification d'un fragment de 323bp (figure 3).

30 La figure 4 montre l'efficacité de l'amplification du couple d'amorces Iag5 et Iag6 sur 2 représentants de chacun des groupes de Salmonelles.

Procédé de détection.

Un format de détection par hybridation sandwich a été utilisé.

35 Deux oligonucléotides s'hybrident simultanément au fragment amplifié dénaturé. L'un d'eux appelé sonde de capture est fixé de façon passive (mais peut aussi être fixé de façon covalente) à la surface d'un puits de plaque de microtitration 96 puits. L'autre appelé sonde de révélation est marqué par un élément facile à mettre en évidence. La sonde de révélation est libre dans le tampon d'hybridation.

40 Les sondes de capture et de révélation sont complémentaires de 2 régions différentes situées à l'intérieur du fragment amplifié.

La sonde de détection dans le cas ici décrit, est liée à un marqueur enzymatique notamment une peroxydase et va servir de sonde de révélation. C'est le cas préférentiellement des oligonucléotides Iag3 et SIm3. D'autres oligonucléotides peuvent être fixés à un support solide de type microplaque, un support particulaire ou membranaire et servir de sonde de capture, ceci particulièrement pour les oligonucléotides Iag4 et SIm4.

Conditions expérimentales:

1) Préparation de l'ADN des Salmonelles

50 Par la méthode d'ébullition en présence de Chelex (Chelex 6%, SDS 0.1%, NP40 1%, Tween 20 1%), on obtient les séquences d'ADN. Ce réactif est commercialisé par Biorad et utilisé selon le protocole du fabricant (ref. Walsh et al. 1991. BioTechniques 10 : 506-513).

2) Amplification

55 Selon la méthode initialement décrite par Saiki et telle qu'exposée par exemple dans le brevet européen EP 0201184.

La PCR est réalisée en utilisant le mélange réactionnel suivant :

EP 0 721 989 A1

50 mM KCl
10mM Tris-HCl pH 8.3
1.5mM MgCl₂
125 µM désoxyribonucléotides (dCTP, dATP, dGTP)
250 µM d'UTP
25 pmoles de chacune des amorces
10ng ADN
1 unité d'Uracyl N Glycosylase
1 unité de Taq polymerase.

Le mélange réactionnel a été réalisé en utilisant 10µl de la solution contenant l'ADN à amplifier sous un volume de 100µl. Le dUTP et l'UNG sont utilisés en système de décontamination (Brevet Life Technologies European Patent Application 0 401 037). Le thermocycler utilisé est le 9600 de Perkin Elmer.

Après une incubation à 50°C pendant 2 min pour permettre l'action de l'UNG et une dénaturation à 95°C pendant 5min, les cycles de température utilisés sont les suivants :

- 5 cycles (95°C 15 sec, 50°C 15 sec, 72°C 15 sec)
- 35 cycles (95°C 15 sec, 57°C 15 sec, 72°C 15 sec)

3) Visualisation de la réaction d'amplification

3-1) Marquage de la sonde de révélation

Les sondes sont marquées à la peroxydase de raifort (ref. PCR protocols, a guide to methods and application: Academic press (1990), 15, p4513-4534) et l'activité de l'enzyme est révélée en colorimétrie.

3-2) Gel d'agarose coloré au BET et hybridation sur membrane

Après amplification, 10µl du produit d'amplification sont déposés sur gel d'agarose et l'ADN est transféré sur membrane selon les techniques classiques (Maniatis). La membrane est préhybridée, 30 min à 68°C en tampon d'hybridation (10X Denhart, 6X SSC, 0.1%SDS) puis hybridée à 42°C pendant 3h avec 60 ng de sonde par ml de tampon d'hybridation.

Un lavage est ensuite effectué selon les étapes suivantes :

- 2 fois 10 min en 2 X SSC - 0.1%SDS à température ambiante.
- 1 fois 30 min en 0.1 X SSC - 0.1% SDS à 42°C.
- 2 fois 10 min en 2 X SSC à température ambiante.

Révélation : La membrane est époncée entre deux feuilles de papier absorbant (papier Whatman 3MM) et posée dans un bac propre et sec.

Le réactif de détection Amersham (réactif de détection ECL RPN 2105) est préparé extemporanément volume à volume : 30 ml de volume total pour une membrane 5 x 8 cm. Une cassette pour autoradiographie est obtenue en fixant une feuille de papier absorbant (papier Whatman 3MM) au fond. Toutes ces étapes peuvent se faire à la lumière. Ensuite en chambre noire.

On baigne la membrane dans le réactif de détection pendant 1 min, côté ADN vers le haut, on égoutte rapidement la membrane, on la place dans la cassette, côté ADN vers le haut, on pose dessus une feuille en plastique transparent (sinon la membrane se colle sur le film) et on met un film radiographique par dessus (film X-OMAT KODAK).

L'exposition est réalisée pendant 30 min à température ambiante puis le film est développé par les techniques de révélation classique (révélateur, eau, fixateur).

3-3) microplaque

3-3-1) Coating de l'oligonucléotide de capture

Il peut se faire par adsorption (Cook et al. NAR, 16: 4077-4095 (1988) ou couplage covalent (Rasmussen, S.R. et al. 1991, Analytical Biochemistry 198, 138-142).

3-3-2)Hybridation en microplaque et lecture

10 µl du produit d'amplification ont été dénaturés par addition volume à volume d'une solution 200mM NaOH, 40mM EDTA.

Les microplaques dont la surface des puits est revêtue de la sonde de capture ont été préhybridées dans un tampon d'hybridation contenant 10XDenhart, 6XSSC, 0.1% SDS.

Puis la microplaque a été vidée et chacune des cupules a reçu 200µl de tampon d'hybridation renfermant le fragment amplifié dénaturé et la sonde de révélation à la concentration de 10ng/µl. L'incubation a eu lieu pendant une heure à 37°C et sous agitation.

Après lavage (solution de lavage 10X : 100mM Tris, 3M NaCl, 1% Tween 20, pH 7.4), l'activité de la peroxydase liée à la sonde a été détectée en colorimétrie en présence d'un substrat coloré.

Pour ce faire, 200µl d'une solution 40mM citrate trisodique, 0.03% H₂O 30%, 7.5mg/ml d'orthophenylenediamine (OPD) ont été distribués dans chacun des puits. La microplaque a été incubée 30min à l'obscurité et à 37°C. 50µl/ puits d'une solution 4N H₂SO₄ ont été ajoutés pour bloquer la réaction.

La densité optique a été déterminée à une longueur d'onde de 492nm (référence à 620nm).

4) Séquençage des produits PCR et alignement manuel des séquences

Selon les techniques classiques en utilisant par exemple un automate "373 DNA sequencer" d'Applied Biosystem et le kit "dye terminator" d'Applied.

Résultats

Le modèle exemplifié est préférentiellement le système d'oligonucléotides suivant :

lag5 amorce sens-lag6 amorce antisens

lag3 sonde de révélation et lag4 sonde de capture.

(il est à noter que lag4 peut tout aussi bien être marquée et être utilisée en sonde de révélation).

Etude de Spécificité

Elle a porté sur l'ensemble des souches bactériennes listées dans les Tableaux 4 et 5.

L'amplification de l'ADN extrait des 45 souches de Salmonelles testées a généré un fragment de la taille attendue (cf. Fig. 5). Les Southern blots de l'ensemble des produits amplifiés ont été hybridés avec la sonde oligonucléotidique interne lag 3 marquée à la peroxydase. Aucune des souches non salmonelles n'a donné lieu à une hybridation avec une sonde peroxydase réalisée sur membrane selon le protocole décrit plus haut.

Les mêmes produits d'amplification ont été testés en format microplaque.

Le cut-off a été arbitrairement fixé à 0.050. Tous les représentants de chacun des groupes de Salmonelles donnent une valeur de densité optique supérieure à 0.050 (tableau 6).

Sensibilité

Pour déterminer le nombre minimal de molécules d'ADN chromosomique de salmonelles pouvant être détecté, une gamme de dilution d'ADN chromosomique purifié a été amplifiée. 5 molécules sont visibles sur l'autoradiographie du southern blot et détectées en hybridation microplaque : la valeur obtenue en colorimétrie est supérieure au Cut-Off (Figure 6).

Les oligonucléotides sélectionnés pour la réalisation de cet exemple ont été localisés sur la séquence du gène lagA (figure 7).

TABLEAU 4

SOUCHES DE SALMONELLES ETUDIEES			
N°	Souches	Sérotype	Groupe
1	<i>Salmonella</i> Marseille		I
2	<i>Salmonella</i> Nyanza		I

EP 0 721 989 A1

TABLEAU 4 (suite)

SOUCHES DE SALMONELLES ETUDIEES			
N°	Souches	Sérotype	Groupe
3	<i>Salmonella Poona</i>		I
4	<i>Salmonella Kampala</i>		I
5	<i>Salmonella Taksony</i>		I
6	<i>Salmonella Teshie</i>		I
7	<i>Salmonella Indiana</i>		I
8	<i>Salmonella enteritidis</i>		I
9	<i>Salmonella Kentucky</i>		I
10	<i>Salmonella Napoli</i>		I
11		841 11 : a, d : en 215	II
12		1703 K 41 : 2 : 15	II
13		950 - 71 43 : d : z 39	II
14		10-65 44 : 24 : 223 : -	II
15		3209-81 45 : z 23	II
16		5331/86 62 : z 29 : -	IIIa
17		3064-4 / 252 41 : k : -	IIIa
18		594-54 38 : z 54 : -	IIIa
19		1694 cda1 426 63 : z 4 : z32 : -	IIIa
20		So 50 / 16 62 : f : z 51 : -	IIIa
21		5251-85 58 : r : z 53	IIIb
22		1785-76 6, 14 : z 10 : enx 215	IIIb
23		453-68 16 : liv : z53	IIIb
24		4305-57 16 : li(v) : z 35	IIIb
25		1698-75 11 : liv : z	IIIb
26		8275-94 47 : r : enx 215	IIIb
27		8283-94 53 : z 10 : z	IIIb
28		cdc 456-5 / 93 40 : i : 1, 5, 7	IIIb
29		8284-94 60 : i : z	IIIb
30		1693 K 38 : k : z 55	IIIb
31		1707 48 : f : z 51 : -	IV
32		7231 / 89 45 : z 36, z 38	IV
33		6887 / 60 48 : f : z 51 : -	IV
34		1357 / 73 43 : z4, z 24 : -	IV
35		1550 K 16 : z 4, z 23 : -	IV
36	<i>Salmonella Bongor</i>	261 -66 48 : z35 : -	V
37	<i>Salmonella Camdeni</i>	2022 - 77 44 : r : -	V
38		4985 - 85 48 : z 39 : -	V
39		7688 - 9166 : z 39 : -	V

EP 0 721 989 A1

TABLEAU 4 (suite)

SOUCHES DE SALMONELLES ETUDIEES			
N°	Souches	Sérotype	Groupe
40		1387 - 7340 : a : -	V
41		1941 - 77 6 7 : z 41 : 1.7	VI
42		1449 K45 : a : enx	VI
43		4355 - 84 1 6 14 25 : a : e.n.x	VI
44		1711 K 11 : b : enx	VI
45		1688 K 1.6 14.25 : Z 10 : 1 12.7	VI

TABLEAU 5

SOUCHES NON SALMONELLES		
N°	Nom	Identification
1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0059 SDP
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0054 SDP
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0033 SDP
4	<i>Proteus mirabilis</i>	RP402
5	<i>Serratia marcescens</i>	0042 SDP
6	<i>Enterobacter agglomerans</i>	0067 SDP
7	<i>Citrobacter diversus</i>	0068 SDP
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0011 SDP
9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0066 SDP
10	<i>Escherichia coli</i>	0131 SDP
11	<i>Enterocoque faecalis</i>	76117
12	<i>Proteus mirabilis</i>	AP03
13	<i>Enterocoque faecalis</i>	76117
14	<i>Enterobacter cloacae</i>	0060 SDP
15	<i>Mycobacterium avium</i>	6
16	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H 37 RV
17	<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2 LG3

TABLEAU 6

DETECTION SUR MICROPLAQUE	
ECHANTILLONS	DO à 420 nm
2 Nyanza gpe I	3.029
3 Poona gpe I	3.103
11 gpe II	3.155
12 gpe II	0.751
18 gpe III a	3.139
20 gpe III a	3.068

TABLEAU 6 (suite)

DETECTION SUR MICROPLAQUE	
ECHANTILLONS	DO à 420 nm
21 gpe III b	3.161
30 gpe III b	3.201
31 gpe IV	0.272
35 gpe IV	0.527
36 gpe V	1.868
40 gpe V	3.347
45 gpe VI	0.900
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.022
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.017
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.024
<i>Proteus mirabilis</i>	0.019
<i>Serratia marcescens</i>	0.015
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0.023
<i>Mycobacterium avium</i> n°6	0.025
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 37 RV	0.020
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 LG3	0.015
Témoin eau	0.018
Témoin eau	0.022

Revendications

1. Séquence de nucléotides participant à l'invasion de cellules HeLa en culture par des bactéries de l'espèce *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérovariété Typhi (dénommée S. Typhi), caractérisée en ce qu'il s'agit de la séquence iagA comprise entre les nucléotides 97 et 1755 de la séquence représentée à la figure 1 ou iagB comprise entre les nucléotides 1776 et 2255 de la séquence représentée à la figure 1.
2. Oligonucléotide issu d'une séquence selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des séquences suivantes :

Iag1: 5'-TA TTA AGT ATG CAG GTT ATG - 3'
 Iag2: 5'-AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA- 3 '
 5 Iag3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3 '
 Iag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3 '
 Iag5: 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3 '
 10 Iag6: 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3 '
 S1m1: 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3 '
 S1m2: 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3 '
 15 S1m3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3 '
 S1m4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3 '
 SS28: 5'-TAA TGC TTT CCT GGT GC-3 ' .
 Iag7: 5'-T ACG GCA TGG GCT GAT TGC T-3 '
 20 Iag8: 5'-T TAC GCT ATC GCC CAG CAG CAG GA-3 '
 Iag9: 5'-T GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT C-3 '
 Iag10: 5'-A CAG TTG TTA CAG GAT CCC T-3 '

- 25 3. Oligonucléotide caractérisé en ce qu'il est issu de la séquence de nucléotides lagA selon la revendication 1 et en ce qu'il est sélectionné parmi les séquences utilisables comme amorces pour la détection spécifique de Salmonella enterica du groupe I ou pour la détection d'une séquence de nucléotides ainsi amplifiée.
- 30 4. Oligonucléotide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il répond à la séquence suivante : SS28: 5'-TAA TGC TTT CCT GGT GC-3'.
5. Couple d'oligonucléotides selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il s'agit de l'un des couples suivants :

35 Iag5 (sens): 5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3' et
 Iag6 (antisens): 5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3', ou

S1m1 (sens): 5'-CG GGT TAA AGG TTA TCA CCT-3' et
 40 S1m2 (antisens): 5'-AG CAT GGC GCA AAT GGG-3'.

- 45 6. Séquence de nucléotides capable de s'hybrider avec Salmonella enterica et/ou Salmonella bongori, caractérisée en ce qu'elle répond à l'une des séquences suivantes et en ce qu'elle est marquée :

Iag3: 5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT -3' ou
 Iag4: 5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3' ou
 S1m3: 5'-GCA CCA GGA AAG CAT TAA GTT GAT AGA ACA C-3' ou
 50 S1m4: 5'-CTT CGC TGG GAC ACA AAG CA-3'.

- 55 7. Séquence de nucléotides selon la revendication 6 (ou sonde), caractérisée en ce que la sonde Iag3 ou la sonde S1m3 est une sonde de révélation de la présence d'une séquence de nucléotides amplifiée et en ce que la sonde Iag4 ou la sonde S1m4 est une sonde de capture d'une séquence de nucléotides amplifiée.
8. Utilisation des oligonucléotides selon la revendication 2, comme amorces pour l'amplification d'une séquence d'ADN ou d'ADNc de Salmonella enterica et/ou de Salmonella bongori comprise dans une séquence de nucléotides

selon la revendication 1 ou complémentaire d'une telle séquence, ou comme sonde pour la détection d'une séquence de nucléotides amplifiée.

- 5 9. Utilisation des couples d'oligonucléotides selon la revendication 5, comme amorces pour l'amplification de séquences de nucléotides d'une bactérie de l'espèce S. enterica et/ou S. bongori, groupe I, II, III, IV, V ou VI.
- 10 10. Ensemble d'oligonucléotides utilisables pour la détection de bactéries S. enterica et/ou S. bongori après amplification de l'ADN génomique ou complémentaire de S. enterica et/ou de S. bongori, caractérisé en ce qu'il comprend :
- 10 - un couple d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, capables d'hybrider dans des conditions stringentes avec l'ADN génomique ou l'ADNc de S. enterica et/ou de S. bongori ;
- une sonde selon la revendication 6
- 15 11. Ensemble d'oligonucléotides utilisables pour la détection *in vitro* dans un échantillon biologique, de souches de Salmonella enterica et/ou de Salmonella bongori appartenant à l'un des groupes I, II, III, IV, V ou VI, caractérisé en ce qu'il contient les oligonucléotides suivants
- 20 - la séquence lag5 (5'-GCA GGG ATC ACT AAG CTG TG-3' et lag6 (5'-CGT GGG CAA CCA GCA CTA ACG-3') utilisables en tant qu'amorces pour l'amplification et
- la séquence lag3 (5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA CGA CTT -3') utilisable comme sonde de révélation et la séquence lag4 (5'-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3') utilisable comme sonde de capture.
- 25 12. Ensemble d'oligonucléotides utilisables pour la détection spécifique *in vitro* dans un échantillon biologique, de S. enterica du groupe I, caractérisé en ce qu'il comprend les oligonucléotides suivants :

SS2 (5'-CCGGGCAGATGATACCC-3' et
SS28 (5'-TAATGCTTTCCTGGTGC-3').

- 30 13. Protéine lagA, caractérisée en ce qu'elle est codée par la séquence de nucléotides lagA selon la revendication 1.
14. Protéine lagA selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement d'acides aminés compris entre les acides aminés 1 et 553 de la séquence de la figure 1.
- 35 15. Protéine lagB, caractérisée en ce qu'elle est codée par la séquence de nucléotides lagB selon la revendication 1.
16. Protéine lagB selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement d'acides aminés compris entre les acides aminés 554 et 713 de la séquence représentée à la figure 1.
- 40 17. Procédé pour la détection *in vitro* dans un échantillon biologique, de séquences de nucléotides Salmonella enterica, préalablement amplifiées, par exemple par PCR et dénaturées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :
- 45 - dénaturation de la séquence de S. enterica amplifiée.
- mise en contact des séquences de nucléotides amplifiées dénaturées de S. enterica, avec une sonde de capture et une sonde de révélation obtenues à partir des oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 2, 6 ou 7 dans des conditions permettant l'hybridation desdites sondes de capture et de révélation avec la susdite séquence de nucléotides amplifiée de S. enterica, la sonde de capture étant fixée à la surface d'un puits d'une plaque de microtitration et la sonde de révélation étant marquée et libre dans le tampon d'hybridation ;
- 50 - incubation du mélange réactionnel, pendant un temps suffisant pour permettre la réaction d'hybridation ;
- lavage pour éliminer les oligonucléotides n'ayant pas réagi ;
- révélation des sondes de révélation ayant hybridé aux séquences de nucléotides amplifiées.
- 55 18. Procédé de détection selon la revendication 17, caractérisé en ce que la sonde de capture est l'oligonucléotide lag4 et la sonde de révélation est l'oligonucléotide lag3 et en ce que la détection est réalisée conformément aux étapes suivantes :

EP 0 721 989 A1

- dénaturation d'un volume 10 μ l de la séquence amplifiée sont dénaturés par addition volume à volume d'une solution 200 mM NaOH, 40mM EDTA.
- préhybridation des microplaques dont la surface des puits est revêtue de la sonde de capture, dans un tampon d'hybridation approprié.
- 5 - libération de la microplaque et remplissage de chacune des cupules avec 200 μ l de tampon d'hybridation renfermant le fragment amplifié dénaturé et la sonde de révélation marquée à la peroxydase à la concentration de 10ng/ μ l.
- incubation du mélange pendant une heure à 37°C sous agitation.
- lavage du mélange ayant réagi avec une solution de lavage 10X (100mM Tris, 3M NaCl, 1% Tween 20, pH 7.4),
- 10 - détection de l'activité de la peroxydase liée à la sonde par colorimétrie en présence d'un substrat coloré.

19. Procédé de détection selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'activité de la peroxydase est détectée par mise en oeuvre des étapes suivantes :

- 15 - dépôt de 200 μ l d'une solution 40mM citrate trisodique, 0.03% H_2O 30%, 7.5mg/ml d'orthophenylenediamine (OPD) dans chacun des puits contenant le mélange de réaction.
- incubation de la microplaque pendant 30min à l'obscurité et à 37°C
- blocage de la réaction par addition de 50 μ l/puits d'une solution 4N H_2SO_4 .
- 20 - détermination de la densité optique à une longueur d'onde de 492nm (référence à 620nm).

1
 GTA CTA GCA GCA GAA TTA CTG AAA CAG TAG ATT CTA TCC TAA CGA CTT GTA TTA GCT ATT
 31
 61
 ATA ACT TTT CAC CCT GTA AGA GAA TAC ACT ATT ATC ATG CCA CAT TTT AAT CCT GTT CCT
 91 *lagA*
 met pro his phe asn pro val pro
 121
 GTA TCG AAT AAA AAA TTC GTC TTT GAT GAT TTC ATA CTC AAC ATG GAC GGC TCC CTC GTA
 151
 val ser asn lys lys phe val phe asp asp phe ile leu asn met asp gly ser leu val
 181
 CGC TCA GAA AAG AAA GTC AAT ATT CCG CCA AAA GAA TAT GCC GTT CTG GTC ATC CTG CTC
 211
 arg ser glu lys lys val asn ile pro pro lys glu tyr ala val leu val ile leu leu
 241
 GAA GCC GCC GGC AAG ATT GTG AGT AAA AAC ACC TTA TTG GAC CAA GTA TGG GGC GAC GCG
 271
 glu ala ala gly lys ile val ser lys asn thr leu leu asp gln val trp gly asp ala
 301
 GAA GTT AAC GAA GAA TCT CTT ACC CGC TGT ATC TAT GCC TTA CGA CGT ATT CTG TCG GAA
 331
 glu val asn glu glu ser leu thr arg cys ile tyr ala leu arg arg ile leu ser glu
 361
 GAT AAA GAG CAT CGT TAC ATT GAA ACA CTG TAC GGA CAG GGT TAT CGG TTT AAT CGT CCG
 391
 asp lys glu his arg tyr ile glu thr leu tyr gly gln gly tyr arg phe asn arg pro
 421
 GTC GTA GTG GTG TCT CCG CCA GCG CCG CAA CCT ACG ACT CAT ACA TTG GCG ATA CTT CCT
 451
 val val val val ser pro pro ala pro gln pro thr thr his thr leu ala ile leu pro
 481
 TTT CAG ATG CAG GAT CAG GTT CAA TCC GAG AGT CTG CAT TAC TCT ATC GTG AAG GGA TTA
 511
 phe gln met gln asp gln val gln ser glu ser leu his tyr ser ile val lys gly leu
 541
 TCG CAG TAT GCG CCC TTT GGC CTG AGC GTG CTG CCG GTG ACC ATT ACG AAG AAC TGC CGC
 571
 ser gln tyr ala pro phe gly leu ser val leu pro val thr ile thr lys asn cys arg
 601
 AGT GTT AAG GAT ATT CTT GAG CTC ATG GAT CAA TTA CGC CCC GAT TAT TAT ATC TCC GGG
 631
 ser val lys asp ile leu glu leu met asp gln leu arg pro asp tyr tyr ile ser gly
 661
 CAG ATG ATA CCC GAT GGT AAT GAT AAT ATT GTA CAG ATC GAG ATA GTT CGG GTT AAA GGT
 691
 gln met ile pro asp gly asn asp asn ile val gln ile glu ile val arg val lys gly
 721
 TAT CAC CTG CTG CAC CAG GAA AGC ATT AAG TTG ATA GAA CAC CAA CCC GCT TCT CTC TTG
 751
 tyr his leu leu his gln glu ser ile lys leu ile glu his gln pro ala ser leu leu
 781
 CAA AAC AAA ATT GCG AAT CIT TTG CTC AGA TGT ATT CCC GGA CTT CGC TGG GAC ACA AAG
 811
 gln asn lys ile ala asn leu leu leu arg cys ile pro gly leu arg trp asp thr lys
 841
 CAA ATT AGC GAG CTA AAT TCG ATT GAC AGT ACC ATG GTC TAC TTA CGC GGT AAG CAT GAG
 871
 gln ile ser glu leu asn ser ile asp ser thr met val tyr leu arg gly lys his glu
 901
 TTA AAT CAA TAC ACC CCC TAT AGC TTA CAG CAA GCG CTT AAA TTG CTG ACT CAA TGC GTT
 931
 leu asn gln tyr thr pro tyr ser leu gln gln ala leu lys leu leu thr gln cys val
 961
 AAT ATG TCG CCA AAC AGC ATT GCG CCT TAC TGT GCG CTG GCA GAA TGC TAC CTC AGC ATG
 991
 asn met ser pro asn ser ile ala pro tyr cys ala leu ala glu cys tyr leu ser met
 1021
 GCG CAA ATG GGG ATT TTT GAT AAA CAA AAC GCA ATG ATC AAA GCT AAA GAA CAT GCG ATT
 1051
 ala gln met gly ile phe asp lys gln asn ala met ile lys ala lys glu his ala ile
 1081
 AAG GCG ACA GAG CTG GAC CAC AAT AAT CCA CAA GCT TTA GGA TTA CTG GGG CTA ATT AAT
 1111
 lys ala thr glu leu asp his asn asn pro gln ala leu gly leu leu gly leu ile asn

figure 1 (1)

EP 0 721 989 A1

```

1141                               1171
ACG ATT CAC TCA GAA TAC ATC GTC GGG AGT TTG CTA TTC AAA CAA GCT AAC TTA CTT TCG
thr ile his ser glu tyr ile val gly ser leu leu phe lys gln ala asn leu leu ser

1201                               1231
CCC ATT TCT GCA GAT ATT AAA TAT TAT TAT GGC TGG AAT CTT TTC ATG GCT GGT CAG TTG
pro ile ser ala asp ile lys tyr tyr tyr gly trp asn leu phe met ala gly gln leu
1261/421                               1291
GAG GAG GCC TTA CAA ACG ATT AAC GAG TGT TTA AAA TTG GAC CCA ACG CGC GCA GCC GCA
glu glu ala leu gln thr ile asn glu cys leu lys leu asp pro thr arg ala ala ala
1321/441                               1351
GGG ATC ACT AAG CTG TGG ATT ACC TAT TAT CAT ACC GGT ATT GAT GAT GCT ATA CGT TTA
gly ile thr lys leu trp ile thr tyr tyr his thr gly ile asp asp ala ile arg leu
1381/461                               1411
GGC GAT GAA TTA CGC TCA CAA CAC CTG CAG GAT AAT CCA ATA TTA TTA AGT ATG CAG GTT
gly asp glu leu arg ser gln his leu gln asp asn pro ile leu leu ser met gln val
1441/481                               1471
ATG TTT CTT TCG CTT AAA GGT AAA CAT GAA CTG GCA CGA AAA TTA ACT AAA GAA ATA TCC
met phe leu ser leu lys gly lys his glu leu ala arg lys leu thr lys glu ile ser
1501                               1531
ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT ATT GCT GTT AAT CTT CTT TAC GCT GAA TAT TGT CAG AAT
thr gln glu ile thr gly leu ile ala val asn leu leu tyr ala glu tyr cys gln asn
1561                               1591
AGT GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA CAG CGT ATA GAT AAT
ser glu arg ala leu pro thr ile arg glu phe leu glu ser glu gln arg ile asp asn
1621                               1651
AAT CCG GGA TTA TTA CCG TTA GTG CTG GTT GCC CAG CGC GAA GCT ATT GCC GAG AAA ATG
asn pro gly leu leu pro leu val leu val ala his gly glu ala ile ala glu lys met
1681                               1711
TGG AAT AAA TTT AAA AAC GAA GAC AAT ATT TGG TTC AAA AGA TGG AAA CAG GAT CCC CGC
trp asn lys phe lys asn glu asp asn ile trp phe lys arg trp lys gln asp pro arg
1741                               1771 1 a g B
TTG ATT AAA TTA CGG TAA AAT CTG AGA GAG GAG AT ATG CAT TAT TTT TTT ATC ATC GTA
leu ile lys leu arg met his tyr phe phe ile ile val
1800                               1830 554
ATC TGG TTG CTT AGC ATA AAT ACG GCA TGG GCT GAT TGC TGG CTT CAG GCT GAA AAA ATG
ile trp leu leu ser ile asn thr ala trp ala asp cys trp leu gln ala glu lys met
1860                               1890
TTC AAT ATT GAA TCC GAA CTA CTT TAC GCT ATC GCC CAG CAG GAA TCG GCG ATG AAA CCT
phe asn ile glu ser glu leu leu tyr ala ile ala gln gln glu ser ala met lys pro
1920                               1950
GGC GCC ATT GGT CAT AAC CGA GAT GGT TCA ACC GAT CTT GGC CTG ATG CAA ATT AAC AGC
gly ala ile gly his asn arg asp gly ser thr asp leu gly leu met gln ile asn ser
1980                               2010
TTC CAT ATG AAA AGG CTG AAA AAA ATG GGG ATT AGT GAA AAA CAG TTG TTA CAG GAT CCC
phe his met lys arg leu lys lys met gly ile ser glu lys gln leu leu gln asp pro
2040                               2070
TGC ATT TCT GTC ATT GTG GGC GCA TCC ATT TTA TCA GAT ATG ATG AAA ATC TAC GGT TTT
cys ile ser val ile val gly ala ser ile leu ser asp met met lys ile tyr gly phe
2100                               2130
AGC TGG GAG GCC GTT GGC GCT TAT AAT GCC GGG ACG TCG CCG AAA CGA TCG GAT ATA AGG
ser trp glu ala val gly ala tyr asn ala gly thr ser pro lys arg ser asp ile arg
2160                               2190
AAA CGT TAT GCT AAA AAA ATT TGG GAG AAT TAC AGA AAA TTA AAA GAG ATG TCA GCA GAA
lys arg tyr ala lys lys ile trp glu asn tyr arg lys leu lys glu met ser ala glu
2220                               2250
GAG AAA AAC AAA AGA CTT TCT ATC GCG GTA AAC AAA TAA TTA TAC AGG AAT AGC TTA CTT
glu lys asn lys arg leu ser ile ala val asn lys
713

```

figure 1 (2)

EP 0 721 989 A1

2280 2310
TCA GAT AAT TCT AAA AGT AAG CTA TGT TTT TAT CAG CTT GCC GTC GTC ATA AGC AAC TGG
2340 2370
GCT TGC ATT GCT TTT AGT TGT ACA AAC TGT GAG GCG TCT TCC AGC ATT CTA TTG TTC CGT
2400
GAA TTC

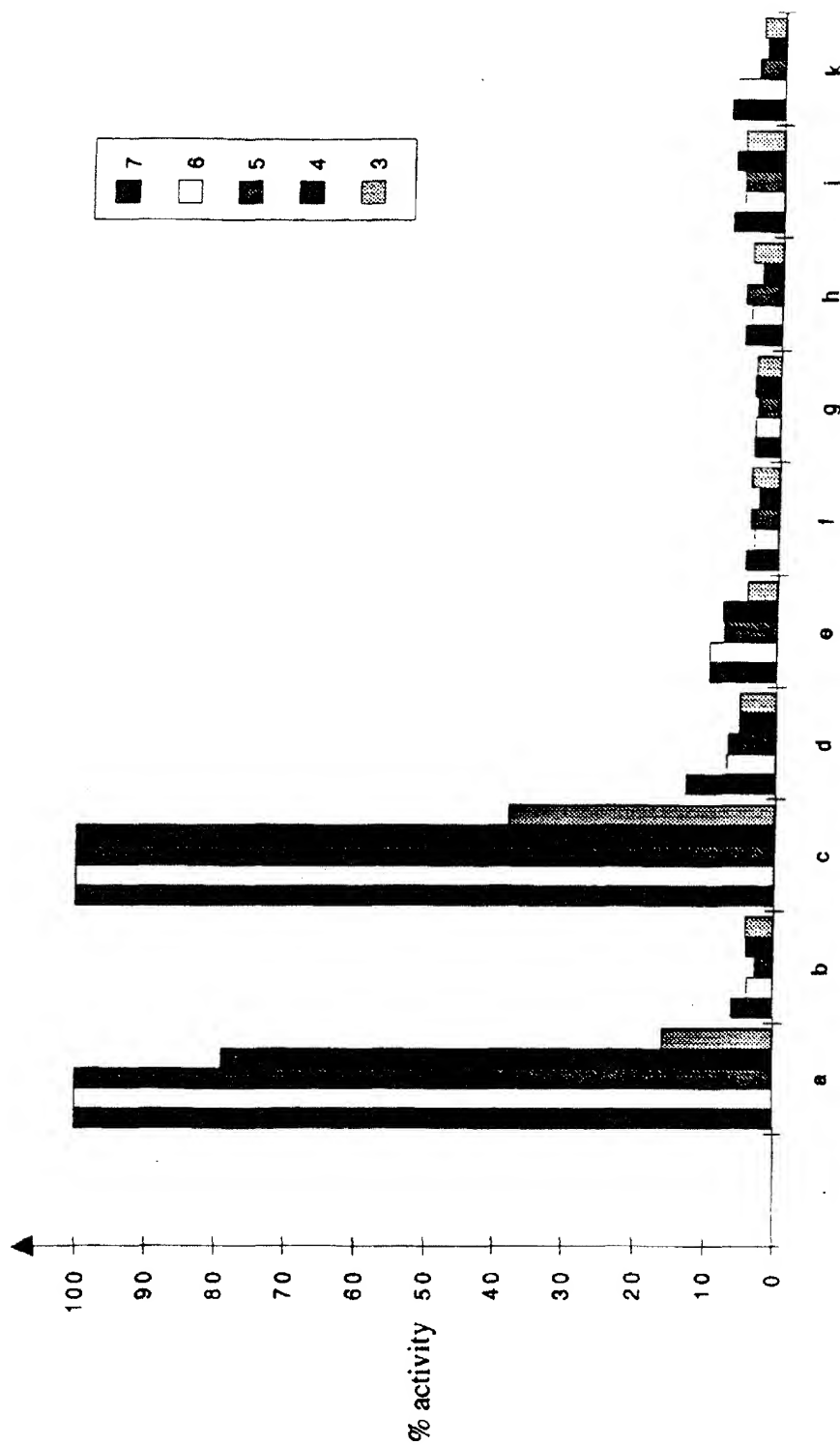


figure 2

ALIGNEMENT SEQUENCES DES FRAGMENTS AMPLIFIES
 (nucléotides 1345 à 1644)
 des 6 GROUPES DE SALMONELLES

	1345	
seq	TAT TAT CAT ACC GGT ATT GAT GAT GCT ATA CGT TTA GGC GAT GAA TTA CGC TCA CAA CAC	
G1	_____T_____	
G2	_____C_____C_____A_____C_____G_____	
G3a	_____G_____C_____A_____T_____T_____	
G3b	_____C_____T_____C_____A_____T_____G_____T_____	
G4	_____G_____T_____C_____T_____T_____T_____T_____	
G5	_____C_____A_____C_____T_____A_____T_____	
G6	_____C_____G_____A_____T_____	
seq	CTG CAG GAT AAT CCA ATA TTA TTA AGT ATG CAG GTT ATG TTT CTT TCG CTT AAA GGT AAA	
G1	_____T_____	
G2	_____C_____T_____	
G3a	_____C_____	
G3b	T_____	
G4	_____A_____C_____	
G5	T_____A_____T_____A_____	
G6	T_____	
seq	CAT GAA CTG GCA CGA AAA TTA ACT AAA GAA ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT ATT	
G1	_____T_____G_____	
G2	_____G_____G_____C_____C_____T_____G_____G_____	
G3a	_____G_____A_____T_____G_____	
G3b	_____A_____T_____G_____	
G4	_____G-T_____G_____A_____C_____G_____G_____	
G5	_____G-CT_____G_____T-A_____T_____G_____	
G6	_____GA_____T_____G_____	
seq	GCT GTT AAT CTT CTT TAC GCT GAA TAT TGT CAG AAT AGT GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA	
G1	_____T_____C_____	
G2	_____A_____T_____C_____A_____G_____	
G3a	_____G_____T_____C_____C_____A_____G_____	
G3b	_____T_____C_____G_____	
G4	_____T_____C_____C_____T_____G_____	
G5	_____A_____T_____C_____G_____	
G6	_____T_____C_____T_____G_____	
	1644	
seq	AGA GAA TTT CTG GAA AGT GAA CAG CGT ATA GAT AAT AAT CCG GGA TTA TTA CCG TTA GTG	
G1	_____	
G2	_____A_____C_____C_____A_____T_____T_____C_____	
G3a	_____G_____AA_____CT_____C_____G_____C_____	
G3b	_____A_____G-T_____C_____A_____G_____C_____	
G4	_____AA_____G_____C_____	
G5	_____A_____A-AA_____T_____C_____C_____T_____G_____CT_____	
G6	_____A_____T_____A_____C_____	

figure 3

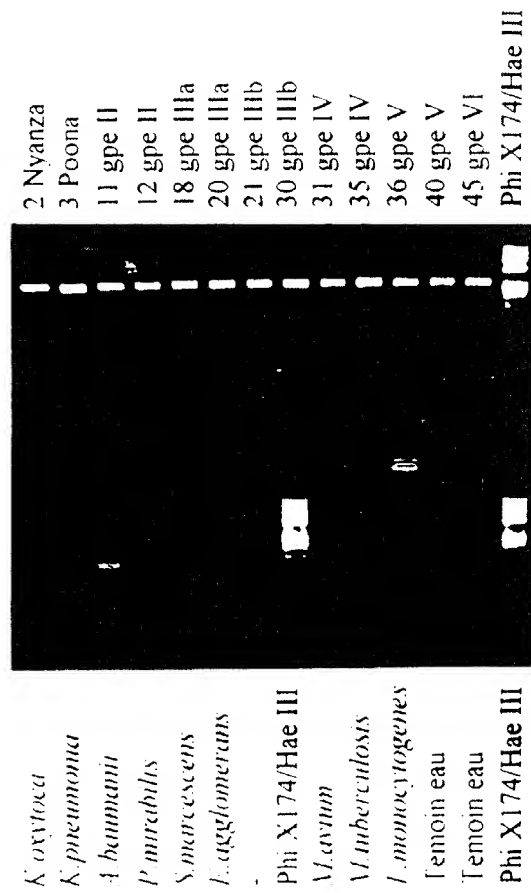


figure 4

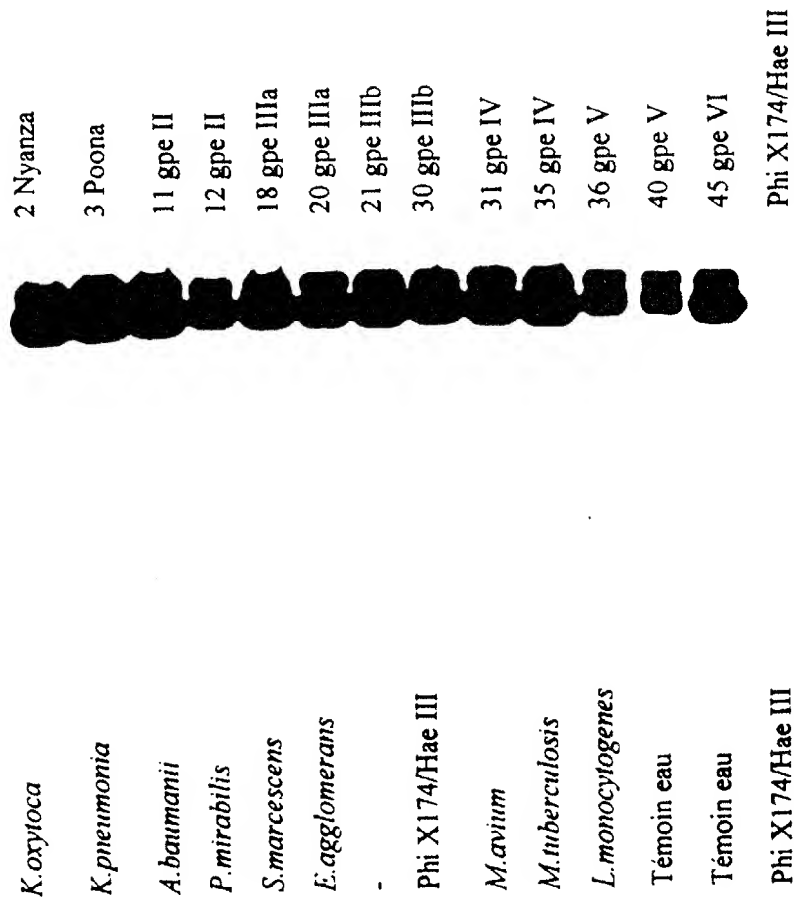


figure 5

SENSIBILITE





nombre de copies	hybridation sur membrane	densité optique microplaque
1		0.020
5		0.351
10		1.912
50		3.123
100		3.200
Témoin eau		0.021

figure 6

Localisation des amorces et des sondes sur la séquence du gene *lagA*

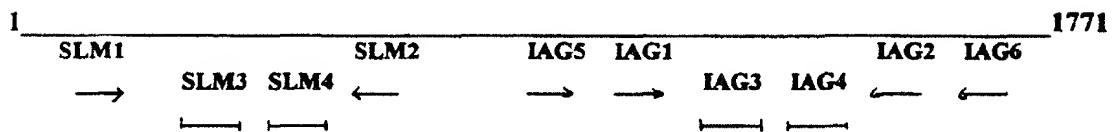


figure 7



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 96 40 0098

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
X	RES. MICROBIOLOGY, vol. 146, no. 1, Janvier 1995, pages 17-20, XP002001767 MIRAS I ET AL: "Nucleotide sequence of iagA and iagB genes involved in invasion of HeLa cells by Salmonella enterica subsp. enterica ser. Typhi" * le document en entier *	1,13-16	C12Q1/68 C07H21/04 C12P19/34 C07K14/255
X A	WO-A-92 01056 (INSTITUT PASTEUR) * le document en entier *	1,13-16 2-12, 17-19	
A	MOL. CELL. PROBES, vol. 7, 1993, pages 187-97, XP002001768 CHEVRIER D ET AL: "PCR product quantification by non-radioactive hybridization procedures using oligonucleotide covalently bound to microwells" * le document en entier *	17-19	
T	FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 10, Février 1995, pages 245-52, XP002001769 CHEVRIER D ET AL: "Rapid detection of Salmonella subspecies I by PCR" * le document en entier *	1-19	
A	WO-A-93 04202 (WASHINGTON UNIVERSITY) * le document en entier *	1	
A	WO-A-95 00664 (BIOTEKNOLOGIST INSTITUT) * le document en entier *	1-19	
		-/--	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 26 Avril 1996	Examineur Osborne, H
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503/03.02 (P4/C02)

EP 0 721 989 A1



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 96 40 0098

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
A	WO-A-93 18165 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LEYLAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) * le document en entier * -----	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 26 Avril 1996	Examineur Osborne, H
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 150 (3.8.92) (P0402)